昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，June 2005，48(3)：450－454　　ISSN 0454-6296

Bt 毒素对棉铃虫雄蛾感受雌蛾性信息素 EAG 反应的影响

穆兰芳，董双林*

(南京农业大学，农业部病虫监测与治理重点开放实验室，南京　210095)

摘要：用含 Bt 毒素的人工饲料饲养棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 3 龄幼虫至成虫(死亡率为 40%～50%)，采用触角电位(electroantennogram，EAG) 技术，测定了雄蛾对雌蛾性信息素 2 种组分顺 9-十六碳烯醛(*Z*9-16：Ald)、顺 11-十六碳烯醛(*Z*11-16：Ald)及其混合物(*Z*11-16：Ald∶*Z*9-16：Ald＝97∶3)的 EAG 反应。结果表明，Bt 毒素对雄蛾感受性信息素单一组分和混合物的 EAG 反应均具促进作用；且随信息素剂量的增加，这种促进作用也随之增强。这一结果对于评价和实施延缓棉铃虫对 Bt 棉抗性的'庇护所'策略，具有一定的参考意义。

关键词：Bt 毒素；棉铃虫；性信息素；EAG 反应

中图分类号：Q965　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2005)03-0450-05

Effects of Bt toxin on EAG responses of male moths of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner) to sex pheromone

MU Lan-Fang，DONG Shuang-Lin* (Key Laboratory of Monitoring and Management of Plant Diseases and Insects，Ministry of Agriculture，Nanjing Agricultural University，Nanjing 210095，China)

Abstract：The third-instar larvae of the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera* (Hübner)，were raised to adult with artificial diet containing Bt Cry1Ac toxin at 40%－50% lethal dose. Electroantennogram (EAG) responses were recorded for those survival male moths and untreated moths. The results indicated that EAG values of Bt toxin treated males to *Z*9-16：Ald，*Z*11-16：Ald and their binary mixture (*Z*11-16：Ald∶*Z*9-16：Ald＝97∶3) were all higher than those of controls，and that differences of the EAG values between treatments and controls became greater as the concentration of the sex pheromone components increased. These results were meaningful in evaluation and implementation of the "refuge" strategy used to postpone the Bt cotton resistance by the cotton bollworm.

Key words：Bt toxin；*Helicoverpa armigera*；sex pheromone；EAG response

昆虫两性间的通讯和交配极易受到外界各种不利因素如气候(光照、温度、湿度)、食物以及化学农药等的影响(Baker and Cardé，1979；Delisle and McNeil，1987)。对多种昆虫的研究已经表明，亚致死剂量的杀虫剂处理可以使昆虫的性信息素通讯系统发生漂移(Clark and Haynes，1992)，不仅可使雌虫性信息素的生物合成受到抑制(Moore，1987)，求偶率降低(Baker，1987)，而且雄蛾对同种性信息素的反应也受到影响(Floyd，1981；Linn，1985；Depluech *et al*.，1998，1999，2001)。由于转 Bt 基因棉(简称 Bt 棉)后期的抗虫性下降，相当数量的棉铃虫幼虫可存活、发育并进入成虫期，这部分成虫由于整个幼虫期一直处于 Bt 毒素的胁迫下，相对于经亚致死剂量短暂处理的成虫而言，它所受到的影响可能更大。

为了明确转 Bt 基因棉(Bt 毒素)对棉铃虫性信息素通讯系统的影响，我们首先在室内条件下，将 Bt Cry1Ac 毒素(同 Bt 棉中的相同)定量掺入人工饲料中饲养棉铃虫幼虫，对存活至成虫的个体利用触角电位测定技术，研究了 Bt 毒素对棉铃虫雄蛾感受雌蛾性信息素能力的影响。

基金项目：国家自然科学基金项目(30270878)；农业结构调整重大技术研究专项(2003-05-02B)

作者简介：穆兰芳，男，1979 年 7 月生，硕士研究生，E-mail：mulangf@163.net

* 通讯作者 Author for correspondence，E-mail：sldong@njau.edu.cn

收稿日期 Received：2004-06-17；接受日期 Accepted：2004-10-18

1　材料和方法

1.1　含 Bt 毒素人工饲料的制备

Bt 菌株 HD-73 由澳大利亚棉花研究所提供，该菌株仅表达 Cry1Ac 毒素。用 BPA 培养基（牛肉膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、氯化钠 5.0 g、水 1 000 mL，pH 7.2～7.4）培养（戴经元等，1994），提取并制备 Bt 毒素冻干粉，在 4℃保存备用（Bt 毒素提取方法由南京农业大学高聪芬老师提供）。采用棉铃虫人工饲料配方（Armes *et al*.，1992），定量加入 Bt 毒素冻干粉制成含 Bt 毒素的人工饲料，4℃冰箱保存，备用。

1.2　试虫与饲养

供试棉铃虫采自大田，室内饲养 3～4 代。养虫室光周期 14L∶10D、温度（25 ± 1）℃、相对湿度 60% ± 10%。幼虫 3 龄前用不含 Bt 毒素的人工饲料群养，3 龄后移至塑料培养皿（直径约 5 cm）内，每皿 1 头；分别用含 Bt 毒素的人工饲料（处理）和不含 Bt 毒素的人工饲料（对照）饲养，直至化蛹。处理组每 2 天换一次新鲜饲料。蛹期时将雌雄分开，置入羽化笼中，逐日检查并将同日龄成虫放于同一羽化笼内，成虫喂以 10% 的蔗糖水，待用。至羽化时，处理组棉铃虫死亡率为 40%～50%，对照组棉铃虫死亡率约 2%。

1.3　EAG 刺激样品的配置

顺 9-十六碳烯醛（*Z*9-16∶Ald）和顺 11-十六碳烯醛（*Z*11-16∶Ald）为棉铃虫雌蛾性信息素的活性组分，其中 *Z*11-16∶Ald 为主要组分。2 个化合物均由上海植物生理生态研究所昆虫化学生态室提供，纯度经气谱检测大于 95%。各性信息素及其混合物（*Z*11-16∶Ald∶*Z*9-16∶Ald = 97∶3）均用重蒸正己烷作溶剂，配置成 10^4、10^3、10^2、10、1、0.1 ng/μL 6 个浓度梯度。

1.4　触角电位仪及测试条件

触角电位仪为 Syntech 公司生产。CS205 刺激控制器，测定时工作条件为：直流电，增益 200。电极通过信号放大器，在计算机上显示，所用软件为 Syntech 公司提供的专用软件。

1.5　EAG 测定方法

以 3 日龄未交配雄虫为试虫，在暗期第 6 h 左右取出（范伟民等，2003），用眼科剪刀将棉铃虫触角自基部剪下，并用锋利刀片切除末端 2～3 节，然后用 Spectra® 360 导电胶将触角横搭在 PR205（Gain 10X）电极上。实验时，用微量进样器抽取 10 μL 性信息素样品到滤纸片上（面积 25 mm × 8 mm），放置 3 min 左右待溶剂挥发后，装入刺激管内。刺激管的出气口对准触角，相距 1 cm。刺激时间 500 ms，刺激间隔约 30 s（保证触角敏感性完全恢复）。测定 6 根触角，每浓度平行刺激 5 次；以重蒸正己烷为空白对照。

对照和处理雄蛾触角的测定交替进行。每根触角先测定对一系列浓度由低到高的 *Z*9-16∶Ald 的反应，再测定对 *Z*11-16∶Ald 的反应，最后测定对二元混合物的反应。

2　结果与分析

2.1　对主要组分 *Z*11-16∶Ald 的 EAG 反应

棉铃虫雄蛾对雌蛾性信息素主要组分 *Z*11-16∶Ald 的 EAG 反应结果如图 1。由图 1 可以看出取食 Bt 毒素人工饲料的棉铃虫雄蛾的 EAG 反应均高于对照。当刺激物剂量低于或等于 10^2 ng/μL 时，差异未达显著水平；当 *Z*11-16∶Ald 的剂量达 10^3 ng/μL 或以上时，两者差异达到极显著水平。

2.2　对次要组分 *Z*9-16∶Ald 的 EAG 反应

*Z*9-16∶Ald 是棉铃虫雌蛾性信息素的次要组分。由图 2 可以看出，处理组棉铃虫雄蛾对 *Z*9-16∶Ald 的 EAG 反应均高于对照雄蛾。当剂量较高时，两者差异达到显著水平。

2.3　对二元混合物的 EAG 反应

处理和对照组棉铃虫雄蛾对雌蛾性信息素二元混合物（*Z*11-16∶Ald∶*Z*9-16∶Ald = 97∶3）的 EAG 反应结果如图 3。同单一组分的结果类似，当混合物的剂量在 1～10 ng/μL 时，处理和对照间没有显著差异；当剂量增加至 10^2 ng/μL 及以上时，处理组雄蛾的反应强度极显著高于对照组。

3　讨论

自从 1996 年 Bt 棉相继在美国和澳大利亚等国进入商品化应用以来，Bt 棉在田间应用已近 10 年，Bt 棉的应用改变了原有棉花与棉铃虫之间的互作关系，有效地抑制了棉铃虫的发生和危害（董双林，1998）。但现在普遍应用的 Bt 棉仍存在 2 个突出的问题，一是棉花生长后期对棉铃虫的抗性下降问题，由此导致对第 3、4 代棉铃虫的抗性效果明显降低，仍需进行必要的化学防治（张天真和唐灿明，2000）；二是棉铃虫的抗性风险问题，由于 Bt 棉不能杀死所

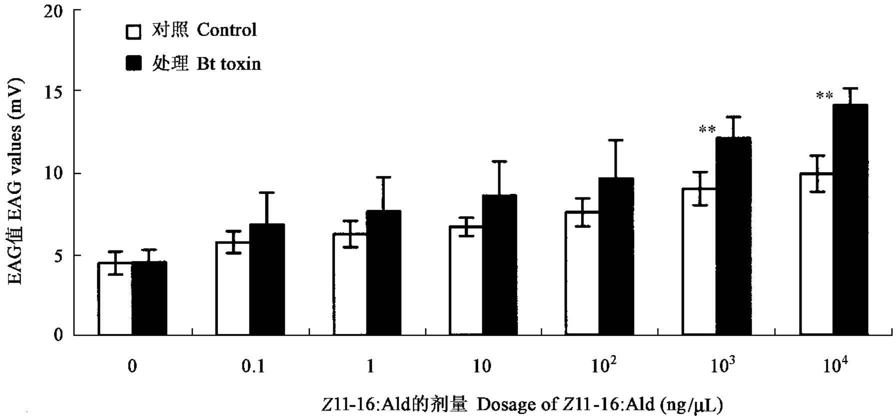

图 1　取食含 Bt 毒素饲料的棉铃虫雄蛾对性信息素主要组分 *Z*11-16∶Ald 的 EAG 反应

Fig. 1　Comparison of EAG responses of *Helicoverpa armigera* male moths to *Z*11-16∶Ald between the Bt toxin treatment and the control

* **表示差异显著**（$P<0.05$），** **表示差异极显著**（$P<0.01$），Student's t-test；**下同。**

Bars topped with" * "are significantly different at $P<0.05$ and with" ** "are extremely significantly different at $P<0.01$ (Student's t-test). The same below.

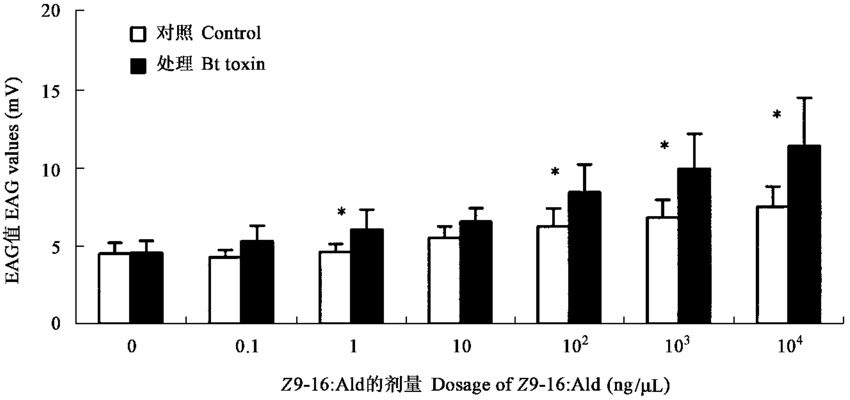

图 2　取食含 Bt 毒素饲料的棉铃虫雄蛾对性信息素次要组分 *Z*9-16∶Ald 的 EAG 反应

Fig. 2　Comparison of EAG responses of *Helicoverpa armigera* male moths to *Z*9-16∶Ald between the Bt toxin treatment and the control

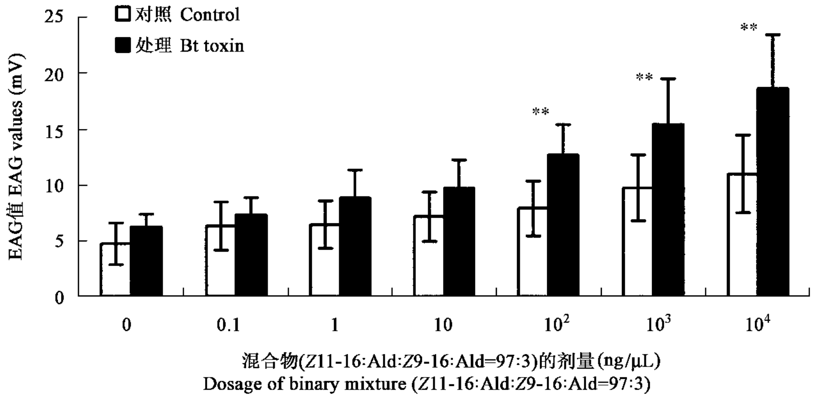

图 3　取食含 Bt 毒素饲料的棉铃虫雄蛾对性信息素二元混合物的 EAG 反应

Fig. 3　Comparison of EAG responses of *Helicoverpa armigera* male moths to binary mixture (*Z*11-16∶Ald∶*Z*9-16∶Ald = 97∶3) between the Bt toxin treatment and the control

有的棉铃虫个体，高强度持续的选择压力显然更有利于棉铃虫抗性基因的筛选。对于后一个问题，建立和利用‘庇护所’、保护棉铃虫的敏感种群，通过敏感种群与可能的抗性种群间的随机交配、稀释抗性基因，是目前普遍采用的应对策略。但如果敏感个体和抗性个体间不能随机交配，这一对策的可行性就有了疑问（谭声江等，2001）。因此，研究 Bt 毒素对棉铃虫性信息素通讯系统的影响，无论对于 Bt 棉棉田后期利用性信息素防治棉铃虫，还是有效实施和评价 Bt 棉抗性预防和治理的‘庇护所’策略都具有重要意义。

本研究结果表明，用含有 Bt 毒素的人工饲料饲养棉铃虫 3 龄幼虫（至羽化时死亡率在 40% ~ 50%），存活雄蛾对较高剂量的雌蛾性信息素（> 100 ng/μL）的 EAG 反应显著增强；而对较低剂量的性信息素的 EAG 反应虽有增加，但未达显著水平。据此并结合对棉铃虫雌蛾单腺体中性信息素二元混合物含量的测定结果（一般低于 100 ng/μL，未发表数据），我们推测，Bt 棉棉田来源的棉铃虫雄蛾对雌蛾性信息素的感受能力可能增强，但在田间自然性信息素浓度条件下，这种增强作用还不足以增加其获得交配的机会。另外，杀虫剂处理也影响雌蛾性信息素的合成和释放，有些杀虫剂能增强雌虫释放性信息素的能力，有些则有抑制作用（Depluech *et al*.，1998，1999，2001），因此，有必要就取食 Bt 棉对雌蛾性信息素合成和释放的影响做进一步研究。还需指出的是，本研究只是对采自田间的相对敏感种群进行了测定，若从 Bt 抗性预防和治理的角度考虑，则需进一步对抗、感种群进行比较研究，以明确它们的交配选择性，为实施和评价‘庇护所’策略提供依据。对此，我们正在进行系统研究。

在昆虫中，信息素分子从触角感觉毛表面孔道弥散进入感器腔，然后与信息素结合蛋白（pheromone binding protein）结合，穿过血淋巴到达感觉神经元树突膜的特定部位（Vogt *et al*.，1981）。在此，信息素与树突膜上的受体相结合，并进一步影响膜的离子通透性，进而引起膜电位的变化，产生感受器电位（Stengl *et al*.，1999）。气味降解酶（odorant degrading enzymes）也在昆虫感受气味物质的过程中产生作用。近来的研究表明，谷胱甘肽转移酶（GSTs）和 P450s 特异地存在于雄蛾触角毛型感器中，具有降解信息素的功能（Rogers *et al*.，1999；Maibeche-Coisne *et al*.，2002，2004）。Bt 毒素对棉铃虫雄蛾感受性信息素的影响，可能涉及这一过程的一个或多个环节，其中的机制有待进一步研究。

参考文献（References）

Armes NJ，Bond GS，Cooter RJ，1992. The laboratory culture and development of *Helicoverpa armigera*. Natural Research Institution，the Scientific Arm of the Overseas Developmental Administration，Bulletin 57. 1 – 46.

Baker TC，Cardé RT，1979. Endogenous and exogenous factors affecting periodicities of female calling and male sex pheromone response in *Grapholitha molesta*（Busck）. *J. Insect Physiol*.，25：943 – 950.

Clark DC，Haynes KF，1992. Sublethal effects of cypermethrin on chemical communication，courtship，and oviposition in the cabbage looper（Lepidoptera：Noctuidae）. *J. Econ. Entomol*.，85：1 771 – 1 778.

Dai JY，Wang B，Luo XX，Yu B，Zhan XM，Yu ZN，1994. Studies on 410 strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from soils. *Journal of Huazhong Agricultural University*，13（2）：144 – 152.［戴经元，王波，罗曦霞，俞波，詹学明，喻子牛，1994. 从土壤中分离的 410 株苏云金芽孢杆菌的鉴定. 华中农业大学学报，13（2）：144 – 152］

Delisle J，McNeil JN，1987. Calling behavior and pheromone titer of the true armyworm *Pseudaletia unipuncta*（Haw.）（Lepidoptera：Noctuidae）under different temperature and photoperiodic conditions. *J. Insect Physiol*.，33：315 – 324.

Delpuech JM，Legallet B，Fouillet P，2001. Partial compensation of the sublethal effect of deltamethrin on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. *Chemosphere*，42：985 – 991.

Delpuech JM，Gareau E，Terrier O，Fouillet P，1998. Sublethal effects of the insecticide chlorpyrifos on the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae*. *Chemosphere*，36：1 775 – 1 785.

Delpuech JM，Legallet B，Terrier O，Fouillet P，1999. Modifications of the sex pheromonal communication of *Trichogramma brassicae* by a sublethal dose of deltamethrin. *Chemosphere*，38：729 – 739.

Dong SL，1998. Advances in research and utilization of transgenic *Bt* cotton for pest control. *Acta Gossypii Sinica*，10（2）：57 – 63.［董双林，1998. 转 *Bt* 基因棉及其抗虫性研究与利用进展. 棉花学报，10（2）：57 – 63］

Fan WM，Sheng CF，Su JW，2003. Electrophysiological and behavioral responses of both sexes of the cotton bollworm，*Helicoverpa armigera*（Hübner）to sex pheromones. *Acta Entomologica Sinica*，46（2）：138 – 143.［范伟民，盛承发，苏建伟，2003. 棉铃虫成虫对性信息素的电生理和行为反应研究. 昆虫学报，46（2）：138 – 143］

Floyd JP，1981. Sublethal effects of permethrin on pheromone response and mating of male pink bollworm moths. *J. Econ. Entomol*.，74：634 – 638.

Linn CE，1985. Multiple effects of octopamine and chlordimdform on pheromone response thresholds in the cabbage looper moth，*Trichoplusia ni*. *Pestic. Sci*.，16：445 – 446.

Maïbèche-Coisné M，Jacquin-Joly E，Francois MC，Meillour PN，2002. cDNA cloning of biotransformation enzymes belonging to the cytochrome P450 family in the antennae of the noctuid moth *Mamestra brassicae*. *Insect Mol. Biol*.，11（3）：273 – 281.

Maïbèche-Coisné M，Nikonov AA，Ishida Y，Jacquin-Joly E，Leal WS，2004. Pheromone anosmia in a scarab beetle induced by *in vivo*

inhibition of a pheromone-degrading enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101(31): 11 459 – 11 464.

Moore RF, 1987. Inhibition of chemical communication between males and females of *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) by sublethal amounts of permethrin. *J. Econ. Entomol.*, 80: 5 – 15.

Rogers M, Jani M, Vogt R, 1999. An olfactory specific gluthanione S-transferase in the sphinx moth *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.*, 202: 1 625 – 1 637.

Stengl M, Ziegelberger G, Boekhoff I, Krieger J, 1999. Perireceptor events and transduction mechanisms in insect olfaction. In: Hansson BS ed. Insect Olfaction. Springer-Verlag. 49 – 66.

Tan SJ, Chen XF, Li DM, Zhang HZ, 2001. Can other host species of cotton bollworm be non-*Bt* refuges to prolong the effectiveness of *Bt*-cotton? *Chin. Sci. Bull.*, 46(13): 1 101 – 1 104. [**谭声江,陈晓峰,李典谟,张惠珍**,2001. **其他寄主作物能成为** *Bt* **感性棉铃虫的庇护所吗?科学通报**,46(13):1 101 – 1 104]

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Zhang TZ, Tang CM, 2000. The application of transgenic cotton and the management of resistance of cotton bollworm. *Chin. Sci. Bull.*, 45(2): 119 – 127. [**张天真,唐灿明**,2000. **转基因抗虫棉品种的推广利用与棉铃虫抗性的治理**. **科学通报**,45(2):119 – 127]

(责任编辑:黄玲巧)